中国生物工程杂志 China Biotechnology,2017,37(7):64-71

DOI:10.13523/j.cb.20170712

同源过表达 *BglR* 对嗜热毁丝霉 β-葡萄糖苷酶活性的影响*

来亚鹏[1,2] 邓婷婷[1,2] 刘 刚[1] 王 娟[1]**
(1 深圳大学生命与海洋科学学院 深圳市微生物基因工程重点实验室 深圳 518060)
(2 深圳市海洋生物资源与生态环境重点实验室 深圳 518060)

摘要 目的:克隆嗜热毁丝霉(*Myceliophthora thermophila* ATCC42464)*bglr* 基因,构建 *Mtbglr* 过表达载体,研究同源过表达 *bglr* 对嗜热毁丝霉 β-葡萄糖苷酶活性及总纤维素酶活性的影响。方法:利用 SLIC 技术构建 *Mtbglr* 过表达载体;使用 MtPpdc 启动子及 MtTpdc 终止子将该基因进行同源过表达;利用原生质体转化、实时荧光定量 PCR 和酶活测定等技术实现 *bglr* 基因在嗜热毁丝霉中表达及酶活水平的鉴定。结果:成功构建 *Mtbglr* 过表达载体,并转化嗜热毁丝霉,结果表明,诱导培养条件下,转化子 Mt8 菌株的 β-葡萄糖苷酶活性和胞外蛋白质浓度分别是 WT 菌株的 1.7 倍和 1.9 倍。结论:*bglr* 基因对嗜热毁丝霉 β-葡萄糖苷酶活性具有增强作用,为嗜热真菌 β-葡萄糖苷酶基因调控奠定了理论基础。

关键词 嗜热真菌 嗜热毁丝霉 同源过表达 β-葡萄糖苷酶 BglR
中图分类号 [Q815]

β-葡萄糖苷酶(β-glucosidase,EC 3.2.1. 21)属于糖苷水解酶。该酶对木质纤维素水解具有关键性作用,是纤维素酶代谢途径中的限速酶[1]。在纤维素酶系降解纤维素的过程中,内切葡聚糖酶(endoglucanase,EC 3.2.1.4) 与外切葡聚糖酶(cellobiohydrolase,EC 3.2.1.91)协同产生纤维二糖,之后被 β-葡萄糖苷酶水解生成葡萄糖,同时解除其对内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶的反馈抑制[2]。β-葡萄糖苷酶已被广泛应用于各种工业领域,如食品、饲料、制药和生物乙醇生产等[3-6]。此外,一些 β-葡萄糖苷酶转糖基作用可用于生产高附加值的稀有寡糖[7]。

根据氨基酸序列相似性,β-葡萄糖苷酶属于糖苷水解酶家族(glycoside hydrolase families)GH 第 1、3、5、9、30 和 116 家族(http://www.cazy.org/)[8],大多数真菌 β-葡萄糖苷酶属于 GH1 和 GH3 家族。至今,许多 GH3 家族的 β-葡萄糖苷酶从不同的真菌中被分离纯化并进行了功能鉴定,如黑曲霉(*Aspergillus niger*)[9]、烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)[10]、桧状青霉(*Penicillium piceum*)[11]、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)[12]。最近,来自嗜热真菌的 β-葡萄糖苷酶由于其具有良好的热稳定性而引起了广泛关注[13-17]。

嗜热毁丝霉(*Myceliophthora thermophila*)是一种嗜热丝状子囊真菌,生长在 45~50℃ 条件下,是生产热稳定性纤维素水解酶的酶工厂[18]。Berka 等[19]于 2011 年对其基因组和蛋白质组的测序结果表明,该菌具有纤维素分解所需的一套完整的酶,可产生大量植物细胞壁降解酶类,高效降解纤维素。近年来,在工业化生产纤维素酶方面,由于嗜热毁丝霉耐高温、纤维素降解酶含量丰富而引起了极大的兴趣[20]。

越来越多嗜热真菌来源的 β-葡萄糖苷酶被分离纯化出来,并将其编码基因克隆表达于异源宿主菌中[21-27],然而关于 β-葡萄糖苷酶调控因子方面的研究却鲜有报道。除通过基因重组技术高效表达 β-葡萄糖苷酶基因之外,了解该酶基因的调控因子,开展其调控网络相关的研究也具有重要意义。Zn(Ⅱ)2Cys6 型锌

收稿日期:2017-01-17 修回日期:2017-03-11
* 深圳市科技计划基础研究项目资助项目(JYJC20140418091413587)
**通讯作者,电子信箱:wangjuan@szu.edu.cn

指蛋白 BglR(β-glucosidase regulator)是通过单核苷酸多态性检测技术,新发现的一个特异性调控 β-葡萄糖苷酶基因表达的转录因子,在里氏木霉中,BglR 能上调 β-葡萄糖苷酶基因的表达[28-29]。本实验拟使用丙酮酸脱羧酶启动子(MtPpdc)及终止子(MtTpdc)在嗜热毁丝霉中过表达 *Mtbglr* 基因,通过酶活测定、胞外蛋白质浓度测定、荧光定量 PCR 等方法确定该基因过表达对 β-葡萄糖苷酶活性的影响。本研究将为嗜热真菌中 β-葡萄糖苷酶的基因调控奠定理论基础。

1　材料与方法

1.1　菌株与质粒

大肠杆菌 JM107:由本学院苟德明教授课题组惠赠;嗜热毁丝霉(*M. thermophila* ATCC42464):购自美国菌种收藏中心(ATCC)。

pAN7-1 质粒:带有真菌筛选标记潮霉素抗性基因 *hph* 及大肠杆菌筛选标记氨苄青霉素抗性基因 Amp^r;pUC19-MtPpdc-MtTpdc 质粒:由本实验室构建[30]。

1.2　培养基及试剂

购自 TaKaRa 公司的 DNA 限制性内切核酸酶*Xba* I、DNA Marker、RNA 提取试剂(RNAiso Plus)、反转录试剂盒(PrimeScript reagent kit)、荧光定量试剂盒 SYBR® Premix Ex *Taq* II(Tli RNaseH Plus);购自 Fermentas 公司的 DNA 限制性内切核酸酶 *Not* I;购自 NEB 公司的 SLIC 连接试剂 T4 DNA polymerase、NE Buffer、超保真 PCR 试剂盒(Phusion® High-Fidelity PCR Kit);购自 Omega 公司的质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒和 DNA 切胶回收试剂盒;购自 Sigma 公司的溶壁酶。其他生化试剂和试剂盒均购自上海生工生物工程股份有限公司(以下简称上海生工)。

孢子洗涤液:用于制备嗜热毁丝霉孢子悬液,为 0.1% 的吐温 -80 溶液。

PDA 培养基:马铃薯 200g/L,葡萄糖 20g/L,琼脂 15 ~20g/L。用于转化子筛选时加入潮霉素 B,终浓度为 50μg/ml。

Mandels 营养盐浓缩液配制:$(NH_4)_2SO_4$,14g/L;尿素,3g/L;KH_2PO_4,20g/L;$CaCl_2 \cdot 2H_2O$,4g/L(或 $CaCl_2$,3g/L);$MgSO_4 \cdot 7H_2O$,3g/L;加水至 1L。

Mandels 微量元素浓缩液配制:$FeSO_4 \cdot 7H_2O$,5g/L;$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$,1.7g/L(或 $ZnCl_2$:0.7g/L);$CoCl_2 \cdot 6H_2O$,3.7g/L(或 $CoCl_2$:2g/L);$MnSO_4 \cdot H_2O$,1.6g/L(或 $MnCl_2$:1.67g/L,或 $MnSO_4 \cdot 7H_2O$:2.6g/L);加水至 1L。

液体基本培养基:含 Mandels 营养盐浓缩液 100ml/L,Mandels 微量元素浓缩液 1.0ml/L,蛋白胨 1.0g/L,无水葡萄糖 20g/L,1mol/L 的柠檬酸缓冲液(pH 4.5)50ml/L,吐温 -80 1.0ml/L。

诱导产酶培养基:Mandels 营养盐浓缩液 200ml/L,Mandels 微量元素浓缩液 1.0ml/L,蛋白胨 10g/L,玉米芯粉(诱导碳源 1%)10g/L。

1.3　嗜热毁丝霉基因组 DNA、RNA 的提取和 cDNA 的合成

接种嗜热毁丝霉孢子于 PDA 平板上,于 45℃ 恒温培养 7d 后,制备适量孢子悬液(约 1×10^7 个新鲜成熟孢子)接种于液体基本培养基中,于 45℃、250r/min 条件下培养 2d 后。取 30ml 菌液进行抽滤,刮取滤纸表面的菌体,用于液氮研磨。使用基因组 DNA 提取试剂盒进行基因组 DNA 的提取。使用 RNAiso Plus 试剂进行 RNA 的提取。将经过 gDNA Eraser 处理过的总 RNA 样品进行反转录,得到相应的 cDNA 模板,冻存于 -20℃ 用于后续实验。

1.4　SLIC 技术进行 Mtbglr 基因的扩增及过表达载体的构建

通过 NCBI 获得里氏木霉(*Trichoderma reesei*)中的 *bglr* 基因(NW_006711177.1),通过 Blast 获得嗜热毁丝霉中同源 *Mtbglr* 基因(XM_003661910.1)。使用 Primer 6.0 引物设计软件获得一对有效扩增 *Mtbglr* 全长的引物 *Mtbglr*-F 和 *Mtbglr*-R(引物序列见表 1)。使用超保真 PCR 试剂盒扩增出 *Mtbglr* 基因全序列。

将本实验室的过表达载体 pUC19-MtPpdc-MtTpdc 经 *Not* I 和 *Xba* I 双酶切后,与带有载体末端 20bp 同源序列的 *Mtbglr* 基因利用不依赖基因序列和连接反应克隆(sequence and ligation-independent cloning,SLIC)技术连接(表 2)[31-32],转化大肠杆菌 JM107。经氨苄抗性筛选,以 MtPpdc-F 和 MtTpdc-R 为上下游引物进行载体完整性 PCR 及测序验证,测序由上海生工完成。

1.5　嗜热毁丝霉原生质体制备及转化

嗜热毁丝霉的原生质体转化方法参照里氏木霉原生质体转化方法并进行了优化[33-34]。将转化子涂布于潮霉素抗性平板和普通 PDA 平板上纯化分离 3 次,直到得到单一的纯菌。将纯菌接种于 PDA 平板上,45℃ 倒置培养 7 天。

表 1 用于扩增 ***Mtbglr*** 和载体完整性以及转化子验证的引物序列

Table 1 Sequences of primers used for amplification of *Mtbglr*, construction of overexpressing vector and verification of transformants

Name	Sequence(5′-3′)	Description
Mtbglr-F	CGCCAACAACAGACGCGGCCATGACGGCGACGGCAGTG	扩增 *Mtbglr* 基因全长
Mtbglr-R	CACCAAGCCACCATCTCTAGCTACCTGGAAAGACCGTTGAAGTC	
MtPpdc-F	CCCAAGCTTCCGAGTGTACTCCGTAAGGA	载体完整性验证引物
MtTpdc-R	CCGGAATTCGGATTACAGCGCAGTGCACG	
P-*Mtbglr*-T1-F	TATCGTGCCTGTGGTCTGA	转化子验证引物
P-*Mtbglr*-T1-R	TGAGCGTTTCCTTGGTGAG	
P-*Mtbglr*-T2-F	ATCGCCGACGGTCAACACTCT	
P-*Mtbglr*-T2-R	TCGTCAAAGCCACGGAATAGA	

Note: The 20bp homologous sequences of pUC19 – MtPpdc – MtTpdc double digestion ends are underlined by double lines

表 2 SLIC 反应体系

Table 2 The reaction system for SLIC

Reagent	Application amount
T4 DNA polymerase	0.5μl
10 × NEBuffer 2.1	1μl
带有载体双酶切末端 20bp 同源序列的 *Mtbglr* 基因	DNA: Vector = 3:1(摩尔比)
双酶切的 pUC19-MtPpdc-MtTpdc 载体	
RNase-Free H_2O	Up to 10μl

1.6 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)

使用 SYBR Green I 嵌合荧光定量 PCR 方法(RT-qPCR)分析目的基因的相对表达量(反应程序:预变性 95℃ 30s;变性 95℃ 5s,退火、延伸 60℃ 31s,共 40 个循环;融解曲线 95℃ 30s,60℃ 30s,95℃ 15s)反应结束后利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的方法计算样品中目的基因相对表达量[35]。基因表达水平以 *beta-tubulin* 基因(GenBank: AE058945.1)为内参对照。所用引物见表 3。

表 3 用于 RT-qPCR 的引物

Table 3 Primers used for RT-qPCR in this work

Name	Sequence(5′-3′)
RTq-*tub*-F	AGGGTATGGATGAGATGGAG
RTq-*tub*-R	AGAAGCAAGCCCTGGAAC
RTq-*bglr*-F	ATCGCCGACGGTCAACACTCT
RTq-*bglr*-R	CGCTTGCTCCTCGTTCATCCTG
RTq-*bgl1*-F	AGCCAGGAGAATGGTAACGC
RTq-*bgl1*-R	TGACAGCCCAAACCCAAACT
RTq-*bgl2*-F	GGCGACCGTAAGAACCTGACTC
RTq-*bgl2*-R	CGGAAGACCAGCCCAGAGAATG
RTq-*bgl3*-F	CGGCGGCTATCTGAACAAGGAG
RTq-*bgl3*-R	CGGCTCGTTGAAGGTGATCCAG
RTq-*egl1*-F	TCGGGCAACGGTTACGAGG
RTq-*egl1*-R	AGCTCTTGACCTGGTTCTGG
RTq-*egl3*-F	TCCGCCACCAGCACCGCCCCTC
RTq-*egl3*-R	TTGCTGCCGAGCCACTTC

1.7 酶活测定和蛋白质浓度测定

酶活测定:将嗜热毁丝霉接种于 PDA 平板上,45℃倒置培养 7 天,参考王宝林的实验用孢子洗涤液(0.2% 吐温 -80 溶液)获得孢子悬液[36]。利用细胞计数板计数,取约 1×10^7 个孢子接入 1% 玉米芯粉为主要碳源的诱导产酶培养基(50ml),45℃,250r/min,摇床振荡培养。从第 3 天到第 8 天取发酵上清液,12 000r/min 离心 10min 进行酶活测定。β-葡萄糖苷酶活(BG activity)、滤纸酶活(filter paper activity)、内切 β-1.4-葡萄糖苷酶活(EG activity)参照国标 QB 2583-2003 及 Eveleigh D E 等的酶活测定方法并加以修改测定[37-38]。

酶活单位定义为 1ml 酶液在 50℃、指定 pH 条件(酸性纤维素酶 pH4.8),1h 水解底物,产生出相当于 1mg 葡萄糖的还原糖量,为 1 个酶活力单位,以 U/g(或 U/ml)表示。以上酶活测定实验,每组均设置 3 个重复。

蛋白质浓度测定:使用改良型 Bradford 法蛋白质浓度测定试剂盒(上海生工,产品编号:C503041)测定样品中蛋白质浓度,具体步骤参照该试剂盒说明书。

2 结果与分析

2.1 *Mtbglr* 过表达载体的构建

使用引物 *Mtbglr*-F 和 *Mtbglr*-R 从嗜热毁丝霉基因

组中进行 PCR 扩增,获得带有载体双酶切末端 20bp 同源序列的 *Mtbglr* 基因全长,(2 257bp),如图 1 所示。pUC19-MtPpdc-MtTpdc 载体经过 *Not* I 和 *Xba* I 双酶切后(3 534bp),与带有载体双酶切末端 20bp 同源序列的 *Mtbglr* 基因利用 SLIC 技术连接,转化 *E. coli*。经过含 100μg/ml 氨苄青霉素抗性平板筛选、载体完整性 PCR 验证及测序,最终成功构建 *Mtbglr* 过表达载体(pUC19-MtPpdc-Mtbglr-MtTpdc)(5 831bp)。载体结构见图 2。

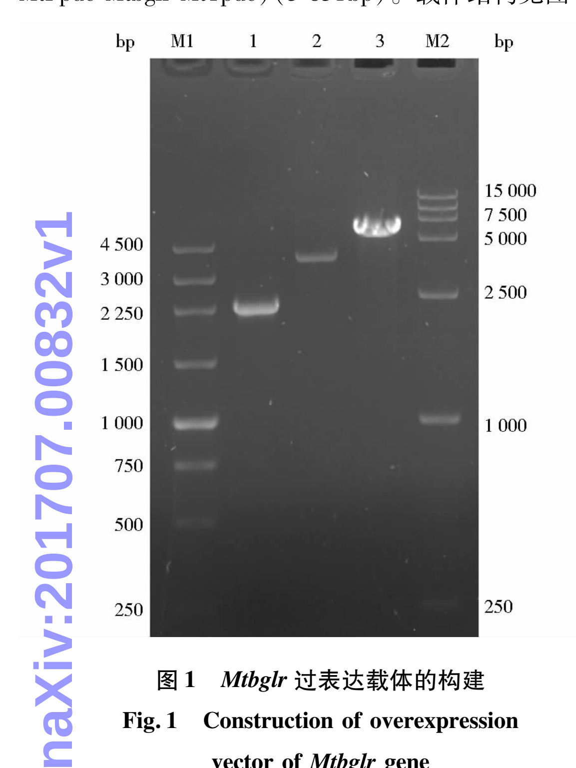


图 1　*Mtbglr* 过表达载体的构建

Fig. 1　Construction of overexpression vector of *Mtbglr* gene

M1:250bp marker; 1: *Mtbglr* gene sequence; 2: pUC19-MtPpdc-MtTpdc sequence; 3: *Mtbglr* overexpression vector sequence; M2: DL 15 000™ marker

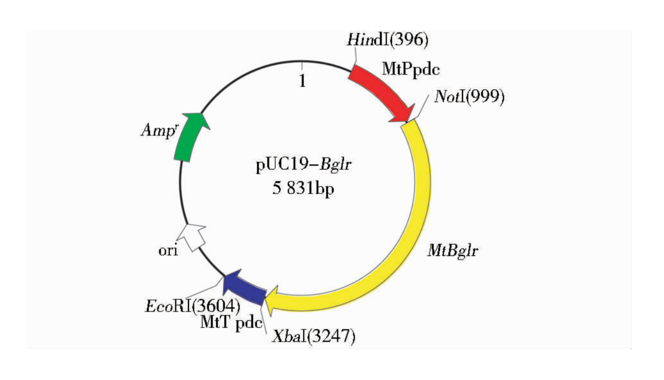


图 2　*Mtbglr* 过表达载体

Fig. 2　Overexpression vector of *Mtbglr* gene

2.2　*Mtbglr* 过表达重组菌株的获得

将 *Mtbglr* 过表达载体与 pAN7-1 质粒共同转化嗜热毁丝霉,经潮霉素抗性 PDA 平板筛选得到 8 株转化子菌株,于普通 PDA 平板上 45℃ 倒置培养 7 天后,提取基因组,分别以 P-*Mtbglr*-T1-F、P-*Mtbglr*-T1-R(518bp);MtPpdc-F、P-*Mtbglr*-T2-R(1 634bp);P-*Mtbglr*-T2-F,MtTpdc-R(2 026bp)这 3 对引物进行基因组 PCR 验证,结果如图 3 所示。并且样品测序结果完全匹配,得到 3 株阳性转化子(或重组菌株)。依次命名为 Mt3、Mt4、Mt8。

2.3　*Mtbglr* 重组菌株 *bglr* 基因表达水平分析

在液体基本培养基培养条件下,使用 RT-qPCR 分析了野生型 WT 和转化子 Mt3、Mt4、Mt8 的 *bglr* mRNA 表达水平。以野生型菌株 WT 的 *bglr* mRNA 表达量为 1 作为对照,转化子菌株 Mt3、Mt4、Mt8 该基因表达量分别为野生型菌株的 147 倍、25 倍、279 倍,见图 4。其中菌株 Mt8 的过表达效果最明显,故选转化子 Mt8 进行后续实验研究。

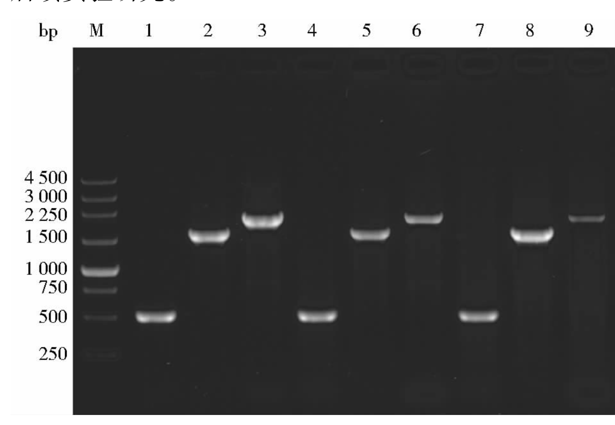


图 3　转化子 PCR 验证产物序列

Fig. 3　Products of PCR amplification in transformants

M:250bp marker; 1-3: Mt3 sequence; 4-6: Mt4 sequence; 7-9: Mt8 sequence; 1,4,7:518bp;2,5,8:1634bp;3,6,9:2026bp

2.4　蛋白质含量和酶活分析

以 1% 玉米芯粉诱导产酶培养基,分别培养野生型菌株 WT 和转化子 Mt8。从第 3 天到第 8 天,每天分别取两菌株的发酵上清液进行酶活和蛋白质含量测定。表 4 显示的第 5 天和第 6 天菌株 WT 和转化子 Mt8 的总分泌蛋白质含量,结果表明 Mt8 的胞外蛋白质含量在第 5 天和第 6 天分别是 WT 的 1.87 倍和 1.92 倍。

在 1% 玉米芯粉诱导产酶条件下培养野生型菌株与转化子菌株,分别测定了其从第 3 天到第 8 天发酵液的滤纸酶活、β-葡萄糖苷酶活、内切 β-1.4-葡萄糖苷酶活。数据如图 5 所示,滤纸酶活在第 4 天达到最高值,

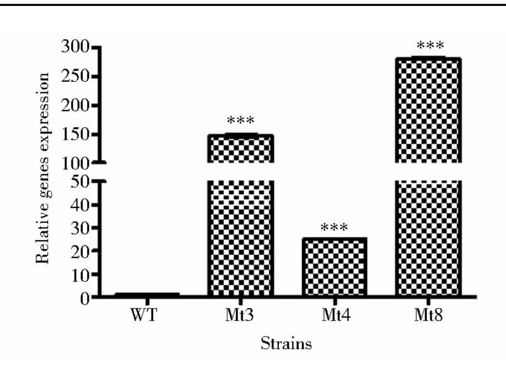


图 4 *bglr* 基因 mRNA 表达水平的荧光定量分析

Fig. 4 RT-qPCR analysis of the *bglr* mRNA levels of wild type and transformants

表 4 诱导条件下野生型菌株和转化子的总蛋白质质含量

Table 4 Total secreted protein concentration of the wild and transformant strain under inducing condition

Strain	Total amount of secreted protein(μg/ml)	
	5 days	6 days
WT(野生型)	103 ± 1.5	106 ± 3.0
Mt8(转化子)	193 ± 2.5	203 ± 5.0

转化子 Mt8 的 FPA 是 WT 的 1.6 倍;内切 β-1,4-葡萄糖苷酶活在第 5 天达到最高值,Mt8 是 WT 的 1.2 倍;β-葡萄糖苷酶活在第 7 天达到最高值,Mt8 是 WT 的 1.7 倍。

图 5 诱导条件下野生型和转化子的纤维素酶活性

Fig. 5 Cellulase activities of the wild strain and tranformant under the inducing condition

(a) are the filter paper (FP) activities (b) β-1, 4-endoglucanase (EG) activities (c) β-glucosidase (BG) activities

2.5 过表达 *Mtbglr* 对嗜热毁丝霉主要纤维素酶基因表达量的影响

在玉米芯粉诱导培养条件下,使用 RT-qPCR 分析了野生型 WT 和转化子 Mt8 的几种主要纤维素酶表达量,包括 β-葡萄糖苷酶基因 *bgl1*、*bgl2*、*bgl3* 和内切 β-1,4-葡萄糖苷酶基因 *egl1*、*egl3* 的表达水平。经内参基因 *beta-tubulin* 校正,设定野生型 WT 中各基因的表达量为 1,计算出转化子 Mt8 中各基因的相对表达量。如图 6 所示,Mt8 中 *bgl1*、*bgl2*、*bgl3*、*egl3* 的表达量分别是 WT 中的 3.5 倍、2.8 倍、2.1 倍、1.6 倍,*egl1* 表达量没有明显差异。上述结果表明,过表达 *bglr* 对嗜热毁丝霉主要纤维素酶基因的表达具有一定的促进作用,

该结果与转化子中 EG、BG 酶活的提高相吻合。

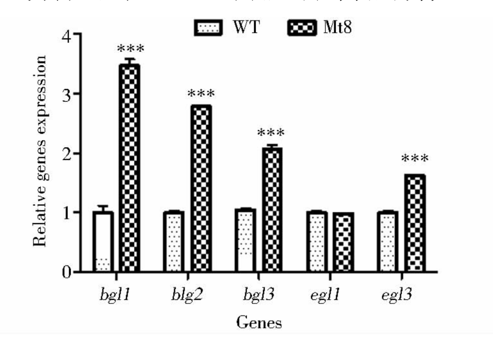


图 6　野生型和转化子主要纤维素酶基因表达水平

Fig. 6　Expression of the main cellulase genes in the wild strain and tranformant

3　讨　论

在丝状真菌中,参与调节酶产量的调控因子众多。在碳代谢阻遏过程中,已知发挥重要作用的主要正调控因子有 Ace2[39]、Hap2/3/5[40],Xyr1[41],负调控因子有 Ace1[42]、Cre1[43]等。在里氏木霉中,*bglr* 基因缺失抑制了诱导初期 β-葡萄糖苷酶对纤维二糖的水解,在 *bglr* 缺失菌株中,*bgl2*、*cel1b* 和 *cel3c* 等 β-葡萄糖苷酶基因表达水平降低且表达时间出现不同程度的延迟,这说明 BglR 可以上调特定 β-葡萄糖苷酶基因的表达[28],本研究在嗜热毁丝霉中过表达 *bglr* 基因,在酶活和基因表达量两方面确定,该基因可促进 β-葡萄糖苷酶基因的表达,增强其基因表达量。获得的结果与里氏木霉中一致,表明在不同的丝状真菌中,该调控因子具有相似的功能。同时我们查询了嗜热真菌嗜热毁丝霉(XP_003661958.1)、太瑞斯梭孢壳霉(XP_003649523.1),以及常温真菌里氏木霉(XP_006969323.1)、粗糙脉孢菌(XP_958079.1)的 BglR 氨基酸序列,通过多重序列比对,发现不同种属的 BglR 基因具有一个高度保守序列——典型的 Zn(Ⅱ)2Cys6 双核基因簇结构(-RACDACHRRKVKCDGINPCRNCSTAQLSCTYNAIPQK-)[28],这对 BglR 的人工改造和分子调控具有重要意义。然而目前关于 BglR 的研究刚刚起步,尚存在许多未知的问题。例如,BglR 的作用位点、功能区域等,以及 BGLR 与其他纤维素酶调控因子之间的关系如何?都有待于进一步的研究去揭示这些问题。

综上所述,本文在嗜热毁丝霉中过表达 *bglr* 基因,可有效提高诱导条件下菌株的滤纸酶活、内切纤维素酶活性及 β-葡萄糖苷酶活性。结合本实验室以前的研究[30,34,44],不难发现针对纤维素酶基因表达调控的研究,是一种改造工业菌株的高效遗传操作方法。明确纤维素酶基因的调控机制,将有利于人们利用分子生物学方法改造工程菌,提高纤维素酶产量。

参考文献

[1] 周庆新,戴炳业,陈蕾蕾,等. 瑞氏木霉中 β-葡萄糖苷酶基因功能研究进展. 中国农业科技导报,2014,16(2):74-78.
Zhou Q X, Dai B Y, Chen L L, et al. Progress on functional studies of β-glucosidase genes in *Trichoderma reesei*. Journal of Agricultural Science and Technology, 2014,16(2):74-78.

[2] Singhania R R, Patel A K, Sukumaran R K, et al. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. Bioresource Technology, 2013, 127: 500-507.

[3] Bhatia Y, Mishra S, Bisaria V S. Microbial β-glucosidases: cloning, properties, and applications. Critical Reviews in Biotechnology, 2002, 22(4): 375-407.

[4] Chandra M, Kalra A, Sangwan N S, et al. Biochemical and proteomic characterization of a novel extracellular β-glucosidase from Trichoderma citrinoviride. Molecular Biotechnology, 2013, 53(3): 289-299.

[5] Handa C L, Couto U R, Vicensoti A H, et al. Optimisation of soy flour fermentation parameters to produce β-glucosidase for bioconversion into aglycones. Food Chemistry, 2014, 152: 56-65.

[6] Abedinifar S, Karimi K, Khanahmadi M, et al. Ethanol production by *Mucor indicus* and *Rhizopus oryzae* from rice straw by separate hydrolysis and fermentation. Biomass and Bioenergy, 2009, 33(5): 828-833.

[7] Pal S, Banik S P, Ghorai S, et al. Purification and characterization of a thermostable intra-cellular β-glucosidase with transglycosylation properties from filamentous fungus *Termitomyces clypeatus*. Bioresource Technology, 2010, 101(7): 2412-2420.

[8] Cantarel B L, Coutinho P M, Rancurel C, et al. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. Nucleic Acids Research, 2009, 37(suppl 1): D233-D238.

[9] Dan S, Marton I, Dekel M, et al. Cloning, expression, characterization, and nucleophile identification of family 3, *Aspergillus niger* β-glucosidase. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(7): 4973-4980.

[10] Liu D, Zhang R, Yang X, et al. Characterization of a thermostable β-glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in Pichia pastoris X33. Microbial Cell Factories, 2012, 11(25):1-15.

[11] Gao L, Gao F, Zhang D, et al. Purification and characterization of a new β-glucosidase from *Penicillium piceum* and its application in enzymatic degradation of delignified corn stover. Bioresource Technology, 2013, 147: 658-661.
[12] Chen P, Fu X, Ng T B, et al. Expression of a secretory β-glucosidase from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris* and its characterization. Biotechnology Letters, 2011, 33(12): 2475-2479.
[13] Haki G D, Rakshit S K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Bioresource Technology, 2003, 89(1): 17-34.
[14] Morgenstern I, Powlowski J, Ishmael N, et al. A molecular phylogeny of thermophilic fungi. Fungal Biology, 2012, 116(4): 489-502.
[15] Basotra N, Kaur B, Di Falco M, et al. *Mycothermus thermophilus* (*Syn. Scytalidium thermophilum*): Repertoire of a diverse array of efficient cellulases and hemicellulases in the secretome revealed. Bioresource Technology, 2016, 222: 413-421.
[16] Xu X, Li J, Shi P, et al. The use of T-DNA insertional mutagenesis to improve cellulase production by the thermophilic fungus *Humicola insolens* Y1. Scientific Reports, 2016, 6: 31108.
[17] Mallek-Fakhfakh H, Belghith H. Physicochemical properties of thermotolerant extracellular β-glucosidase from *Talaromyces thermophilus* and enzymatic synthesis of cello-oligosaccharides. Carbohydrate Research, 2016, 419: 41-50.
[18] Matsakas L, Antonopoulou I, Christakopoulos P. Evaluation of *Myceliopthora thermophila* as an enzyme factory for the production of thermophilic cellulolytic enzymes. Bio Resources, 2015, 10(3): 5140-5158.
[19] Berka R M, Grigoriev I V, Otillar R, et al. Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. Nat Biotechnol, 2011, 29(10):922-927.
[20] Visser H, Joosten V, Punt P J, et al. RESEARCH: Development of a mature fungal technology and production platform for industrial enzymes based on a *Myceliophthora thermophila* isolate, previously known as *Chrysosporium lucknowense* C1. Industrial Biotechnology, 2011, 7(3): 214-223.
[21] Karnaouri A, Topakas E, Paschos T, et al. Cloning, expression and characterization of an ethanol tolerant GH3 β-glucosidase from *Myceliophthora thermophila*. Peer J, 2013, 1: e46.
[22] Zhao J, Guo C, Tian C, et al. Heterologous expression and characterization of a GH3 β-glucosidase from thermophilic fungi *Myceliophthora thermophila* in *Pichia pastoris*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 177(2): 511-527.
[23] Murray P, Aro N, Collins C, et al. Expression in *Trichoderma reesei* and characterisation of a thermostable family 3 β-glucosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*. Protein Expression and Purification, 2004, 38(2): 248-257.
[24] Hong J, Tamaki H, Kumagai H. Cloning and functional expression of thermostable β-glucosidase gene from *Thermoascus aurantiacus*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 73(6): 1331-1339.
[25] Yang X, Ma R, Shi P, et al. Molecular characterization of a highly-active thermophilic β-glucosidase from *Neosartorya fischeri* P1 and its application in the hydrolysis of soybean isoflavone glycosides. PLoS One, 2014, 9(9): e106785.
[26] Guo Y, Yan Q, Yang Y, et al. Expression and characterization of a novel β-glucosidase, with transglycosylation and exo-β-1, 3-glucanase activities, from *Rhizomucor miehei*. Food Chemistry, 2015, 175: 431-438.
[27] Xia W, Xu X, Qian L, et al. Engineering a highly active thermophilic β-glucosidase to enhance its pH stability and saccharification performance. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9(1): 147.
[28] Nitta M, Furukawa T, Shida Y, et al. A new Zn (II) 2 Cys 6-type transcription factor BglR r-egulates β-glucosidase expression in *Trichoderma reesei*. Fungal Genetics and Biology, 2012, 49(5): 388-397.
[29] Tani S, Kawaguchi T, Kobayashi T. Complex regulation of hydrolytic enzyme genes for cellulosic biomass degradation in filamentous fungi. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(11): 4829-4837.
[30] Wang J, Wu Y, Gong Y, et al. Enhancing xylanase production in the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* by homologous overexpression of Mtxyr1. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2015, 42(9): 1233-1241.
[31] Li M Z, Elledge S J. Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. Nature Methods, 2007, 4(3): 251-256.
[32] Jeong J Y, Yim H S, Ryu J Y, et al. One-step sequence-and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics studies. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(15): 5440-5443.
[33] Penttilä M, Nevalainen H, Rättö M, et al. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Gene, 1987, 61(2): 155-164.
[34] Yang F, Gong Y, Liu G, et al. Enhancing cellulase production in thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* ATCC42464 by RNA interference of cre1 gene expression. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 25(7): 1101-1107.
[35] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[36] 王宝林,韩燕峰,王玉荣,等. 一株嗜热毁丝霉菌株产纤维素酶条件优化. 酿酒科技,2012,(10):27-31.
Wang B L, Han Y F, Wang Y R, et al. Optimization of cellulase-producing conditions of A *Thermophilic myceliophthora* sp. H127-1 strain. Liquor-Making Science & Tcchnology, 2012,(10):27-31.

[37] Eveleigh D E, Mandels M, Andreotti R, et al. Measurement of saccharifying cellulase. Biotechnology for Biofuels, 2009, 2(1): 21.

[38] Mansour A A, Da Costa A, Arnaud T, et al. Review of lignocellulolytic enzyme activity analyses and scale-down to microplate-based assays. Talanta, 2016, 150: 629-637.

[39] Aro N, Saloheimo A, Ilmén M, et al. ACEII, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(26): 24309-24314.

[40] Zeilinger S, Ebner A, Marosits T, et al. The *Hypocrea jecorina* HAP 2/3/5 protein complex binds to the inverted CCAAT-box (ATTGG) within the *cbh2* (cellobiohydrolase II-gene) activating element. Molecular Genetics and Genomics, 2001, 266(1): 56-63.

[41] Stricker A R, Grosstessner-Hain K, Würleitner E, et al. Xyr1 (xylanase regulator 1) regulates both the hydrolytic enzyme system and D-xylose metabolism in *Hypocrea jecorina*. Eukaryotic cell, 2006, 5(12): 2128-2137.

[42] Aro N, Ilmén M, Saloheimo A, et al. ACEI of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1): 56-65.

[43] Portnoy T, Margeot A, Linke R, et al. The CRE1 carbon catabolite repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: a master regulator of carbon assimilation. BMC Genomics, 2011, 12(1): 269.

[44] Wang S, Liu G, Yu J, et al. RNA interference with carbon catabolite repression in *Trichoderma koningii* for enhancing cellulase production. Enzyme and Microbial Technology, 2013, 53(2): 104-109.

The Influence of Homologous Iverexpression of *BglR* on β-glucosidase Activities in *Myceliophthora thermophila*

LAI Ya-peng[1,2]　DENG Ting-ting[1,2]　LIU Gang[1]　WANG Juan[1]

(1 College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen Key Laboratory of Microbial Genetic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen　518060, China)

(2 Shenzhen Key Laboratory of Marine Bioresources and Ecology, Shenzhen　518060, China)

Abstract　Objective: The influence of overexpression of β-glucosidase regulator BglR on beta-glucosidase activities in *Myceliophthora thermophila* ATCC42464 by cloning *bglr* gene and constructing *Mtbglr* overexpression vector were focused on. Methods: The SLIC was adopted to construct *Mtbglr* overexpression vector and the promoter of MtPpdc and terminator of MtTpdc was used for overexpress *bglr* gene. The gene expression and β-glucosidase activities were observed by protoplast transformation, real-time quantitative PCR and enzymatic determination. Results: The *bglr* gene was overexpressed in *M. thermophila* successfully. The result showed that the β-glucosidase activity and secreted protein concentration of transformant strain Mt8 were 1.7 and 1.9 fold higher, respectively, than that of wild type WT. Conclusion: The expression of *bglr* increased the β-glucosidase activity in *M. thermophila* under the inducing condition, which laid the theoretical foundation for the regulation of β-glucosidase gene of thermophilic fungi.

Key words　Thermophilic fungi　*M. thermophila*　Homologous overexpression　β-glucosidase　BglR